

L'OVOGÉNÈSE ET LA REPRODUCTION CHEZ *HETERODERA ORYZAE* ET *H. SACCHARI* (NEMATODA: HETERODERIDAE)

PAR

C. NETSCHER

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Abidjan - Côte d'Ivoire

Une étude cytologique d'*Heterodera oryzae* et *Heterodera sacchari* a démontré qu' *H. oryzae* était une espèce diploïde possédant 18 chromosomes et *H. sacchari* une espèce triploïde à 27 chromosomes. Pendant l'ovogénèse d'*H. oryzae* le nombre de chromosomes est réduit à neuf alors qu'*H. sacchari* a une maturation d'un type mitotique et le nombre de chromosomes n'est pas réduit.

Des inoculations monolarves ont démontré qu'*H. oryzae* était une espèce amphimictique et *H. sacchari* une espèce parthénogénétique.

Les deux espèces africaines d'*Heterodera* décrites jusqu'à présent, *H. oryzae* Luc & Berdon et *H. sacchari* Luc & Merny sont des parasites du riz. Les élevages d'*Heterodera oryzae* contiennent toujours des mâles en nombre important. Par contre ceux d'*Heterodera sacchari* n'en ont pas, en général, sauf dans le cas de cultures surpeuplées (Netscher, Luc & Merny 1969). Ces faits suggèrent qu'*H. oryzae* pourrait se reproduire par voie sexuée tandis qu'*H. sacchari* serait parthénogénétique. Une étude cytologique et des inoculations monolarves sur riz ont confirmé cette présomption.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les expériences entreprises avec *H. oryzae* ont été effectuées sur du matériel vivant, provenant de la souche obtenue en 1961 par R. Berdon-Brizuela et entretenue sur riz de la variété „Moroborekan” au laboratoire de Nématologie de l'O.R.S.T.O.M. Les échantillons d'*Heterodera sacchari* provenaient de racines de canne à sucre envoyées en 1961 au laboratoire de Nématologie par la Société Industrielle et Agricole du Niari à Jacob (Congo-Brazzaville) et entretenus depuis sur canne à sucre de la variété P.O.J. 2878.

Les larves d'*H. oryzae* sont obtenues en mettant à éclore, dans de l'eau ordinaire, des masses d'oeufs prélevées sur des femelles blanches; celles d'*H. sacchari* sont obtenues par extraction de sol, portant des cannes à sucre parasitées par ce nématode, avec l'élutriateur de Seinhorst. Pour les études cytologiques, de jeunes semences de riz (variété „Moroborekan”) cultivées en pot de 12 cm de diamètre sont inoculées avec 1000 larves. Après 18 à 20 jours les plantes sont prélevées, les

30 SEP. 1969

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire
N° : 13431
Cote : B

racines soigneusement lavées et les jeunes femelles blanches transférées avec des pinces fines sur des porte-objets. Après décapitation au moyen d'un scalpel aiguisé, le contenu des femelles, les gonades comprises, est étalé sur la lame. Les lames sont ensuite submergées pendant cinq minutes dans de l'acide chlorhydrique normal, puis fixées dans l'alcool acétique et colorées à l'orceine propionique à 2%, enfin elles sont rincées et montées dans l'acide acétique à 45% selon la méthode de Triantaphyllou (1962). Des infestations monolarves ont été effectuées de la manière suivante: une graine de riz est mise à germer dans une boîte de Petri en plastique sur papier filtre mouillé. Après cinq jours une larve est prélevée à l'aide d'une micropipette et déposée sur le bout de la racine nouvellement formée. Immédiatement après cette inoculation la racine est couverte d'un peu de sable à l'endroit où le nématode a été placé. Ces manipulations sont effectuées sous la loupe binoculaire. Ensuite on pose sur la boîte le couvercle percé de deux trous, l'un au milieu pour permettre aux parties aériennes de la plantule de sortir, l'autre au bord pour introduire l'eau d'arrosage. Quotidiennement, les boîtes reçoivent une petite quantité de solution nutritive, suffisante pour tenir le sable légèrement humide. Cinq semaines après l'inoculation les racines sont examinées pour détecter la présence de femelles. La présence d'oeufs chez ces femelles est déterminée après coloration des gonades à l'orceine.

RESULTATS

Heterodera oryzae

Ovogénèse. La structure des gonades d'*H. oryzae* correspond à celle d'*H. glycines* telle qu'elle a été décrite par Triantaphyllou et Hirschmann (1962). De rares mitoses ont été observées dans la zone de multiplication de la gonade et les noyaux sont pratiquement invisibles dans la zone de croissance. La spermathèque consiste en une vessie hémisphérique à paroi mince. Contrairement à la spermathèque d'*H. glycines*, la présence de noyaux n'a pas été constatée dans sa paroi. Chez les femelles fécondées, la spermathèque et le début de l'utérus sont remplis de spermatozoïdes sphériques (Fig. 1. A).

Les chromosomes méiotiques apparaissent après que les oocytes aient franchi la spermathèque. Au niveau du pôle antérieur de l'oeuf on observe la présence d'un spermatozoïde qui a pénétré dans l'oocyte. Le premier stade observé est la proméiotaphase (Fig. 1. B). Bien que les chromosomes soient dispersés dans le noyau, leur groupement en paires est fréquemment observé. A ce stade 18 chromosomes d'aspect punctiforme ont été comptés. Peu de noyaux ont été observés en métaphase I. Les chromosomes forment alors neuf bivalents qui se regroupent parfois par suite de la pression exercée sur la lamelle en préparant les lames (Fig. 1. C). En anaphase I, les chromosomes se déposent en deux plans parallèles, très proches l'un de l'autre, perpendiculaires à l'axe longitudinal de l'oocyte (Fig. 1. D). Ensuite le fuseau tourne de 90 degrés et, en même temps, le noyau se déplace vers la paroi de la cellule (Fig. 1. E). Une fois arrivé à la paroi, la télophase I suit et

C. NETSCHER: *Ovogénèse et reproduction chez Heterodera*.

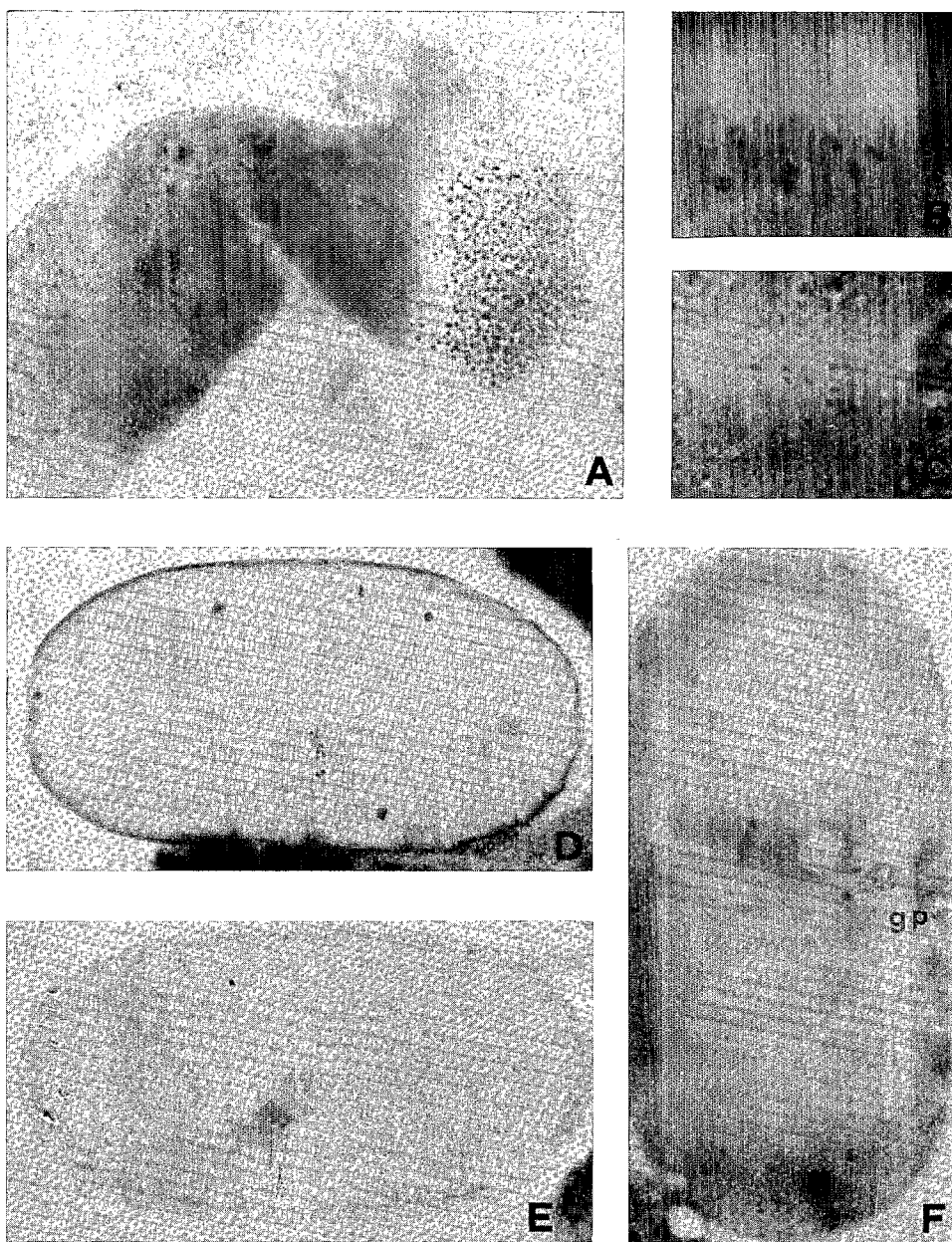


Fig. 1. Meiose d'*Heterodera oryzae*; A: spermatheque, B: prométaphase, C: métaphase, D, E: anaphase I, F: métaphase II (gp: globule polaire, s: spermatozoïde).

C. NETSCHER: *Ovogénèse et reproduction chez Heterodera*.

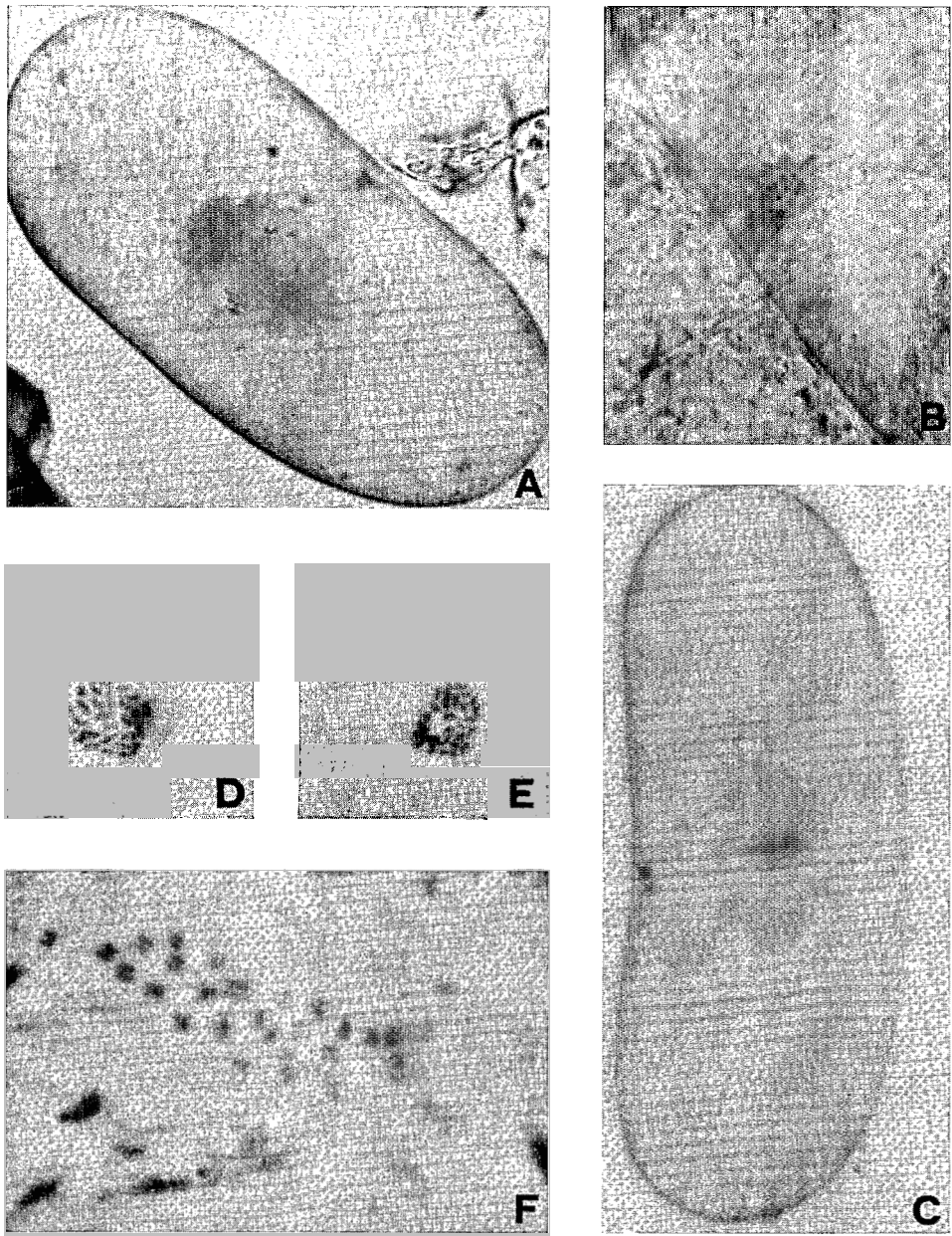


Fig. 2. A-C: méiose d'*Heterodera oryzae*; A: fusion des pronuclei, B: télophase I, des 18 chromosomes présents 12 sont visibles, C: première division de l'oeuf, D-F: maturation d'*Heterodera sacchari*; D, E: plaques télophasiques de la première division de la méiose, F: métaphase I.

le premier globule polaire est formé. Pendant les premiers stades de cette division le spermatozoïde n'a pas changé de place ni de structure. Au cours de la télophase I ses chromosomes peuvent être distingués et, une fois, nous avons pu compter neuf chromosomes. Après la formation du premier globule polaire, la deuxième division suit et un deuxième globule polaire est formé. En ce qui concerne la méiose II, seule la métaphase II a pu être observée (Fig. 1. F).

Après les deux divisions méiotiques, les deux pronuclei s'approchent et fusionnent au milieu de l'oeuf (Fig. 2. A). Au moment de la fusion les chromosomes présentent une forme allongée et disparaissent tout de suite après. La première division de l'oeuf suit ce dernier stade. Pendant cette division les chromosomes sont dirigés selon un plan perpendiculaire à l'axe de l'oeuf (Fig. 2. C).

Infestation monolarve

Sur 50 plantules de riz «Moroborekan» inoculées, sept portaient une femelle blanche. Après cinq semaines, aucune de ces femelles n'avait produit d'oeufs, tandis que dans les infestations multilarves les oeufs sont produits trois semaines après inoculation; les femelles observées ne contenaient pas de spermatozoïdes et présentaient des gonades peu développées. La formation d'oocytes ne fut pas observée.

Heterodera sacchari

Contrairement à *H. oryzae* qui dépose une grande partie de ses oeufs dans une masse gélatineuse extérieure, tous ceux d'*H. sacchari* sont contenus dans le kyste. En conséquence, l'utérus des femelles encore très jeunes occupe une place importante dans le corps à cause des oeufs qu'il contient, les autres parties des deux gonades étant comprimées dans un petit volume. L'extrême resserrement des ovaires rend les observations difficiles. En plus, la plupart des oocytes contiennent des globules qui accroissent la difficulté des observations cytologiques. Les chromosomes se colorent moins nettement que ceux d'*H. oryzae* et ne peuvent être analysés en détail qu'au moyen de la microscopie en contraste de phase. En métaphase I, les chromosomes forment 27 paires de chromatides parallèles en forme de traits allongés (Fig. 2 F). En général les chromosomes sont situés dans un plan oblique par rapport à l'axe de la cellule. La formation de bivalents n'a pas été constatée. Comme chez *H. oryzae*, les chromosomes se trouvent près de la paroi de l'oocyte à la fin de l'anaphase I. Lors de la télophase I, on distingue encore très bien les chromosomes. Une seule fois il a été possible de compter 27 chromosomes dans chacune des deux plaques télophasiques (Fig. 2 D). Il n'a pas été observé de deuxième division méiotique.

Infestation monolarve

Sur 50 plantules de riz inoculées avec une seule larve, sept portaient une femelle blanche. Chacune était remplie d'oeufs viables. Actuellement une souche monolarve d'*H. sacchari* a été établie.

Nombre d'observations

Parmi les 300 femelles d'*H. oryzae* observées on a presque toujours vu des oocytes en prophase I ou en métaphase I et on pouvait compter le nombre diploïde de 18 chromosomes. Dans un seul cas, un noyau vraisemblablement en télophase I, situé en contact de la paroi cellulaire avait 18 chromosomes (Fig. 2 B). Chez *H. sacchari*, beaucoup moins de comptages ont été effectués, bien que le nombre de femelles examinées, dépasse le double de celles qui ont été étudiées chez *H. oryzae*. Dans 17 cas, 27 chromosomes ont été comptés, dans trois cas, 24 chromosomes seulement ont pu être observés.

DISCUSSION

Le nombre de chromosomes a une influence profonde sur la reproduction des différentes espèces d'*Heterodera*. Comme dans les autres espèces bisexuelles étudiées (Cotten, 1960, 1965; Mulvey, 1960; Triantaphyllou & Hirshmann, 1962) *H. oryzae* est diploïde et possède 18 chromosomes. La méiose d'*H. oryzae* ressemble à celle d'*H. glycines*. La rotation du fuseau après la métaphase I a également été observée chez *H. avenae* (Mulvey, 1959).

Les observations faites chez *H. sacchari* démontrent que la maturation de cette espèce est d'un type mitotique, sans réduction du nombre des chromosomes. Mulvey (1960) a signalé 27 chromosomes chez une souche parthénogénétique d'*H. trifolii*. Bien que cet auteur n'ait pas donné de détails, il est probable que la maturation de cette espèce ressemble à celle d'*H. sacchari*.

Le rôle des mâles est en accord avec le mode de reproduction. Chez les espèces amphimictiques, la présence de mâles est indispensable à la reproduction. Nos observations sur *H. oryzae* confirment celles de Ellenby (1957), Golden (1959) et den Ouden (1960).

Par contre, des mâles n'ont pas été trouvés dans la souche parthénogénétique d'*H. trifolii* étudiée par Mulvey. Parmi le petit nombre de mâles trouvés chez *H. sacchari* 20% n'ont que des organes copulateurs réduits ou anormaux (Netscher, Luc & Merny, 1969), ce qui suggère que ces mâles ne sont pas fonctionnels.

Une situation ressemblant à celle des *Heterodera* parthénogénétiques existe chez le genre voisin *Meloidogyne*. La reproduction de la plupart des espèces étudiées est parthénogénétique (Triantaphyllou, 1962, 1963, 1966; Tyler, 1933). A l'exception de *M. hapla*, les espèces étudiées ont une maturation mitotique et sont probablement polyploïdes (Triantaphyllou, 1966). Triantaphyllou a tenté d'établir une hypothèse en vue d'expliquer la cohérence phylogénique des différents Heteroderidae. Selon son schéma, *H. schachtii* aurait été l'ancêtre des *Heterodera* triploïdes. Un développement analogue aurait pu conduire à la formation d'*H. sacchari*. Dans une rizière de Côte d'Ivoire *H. oryzae* et *H. sacchari* ont été trouvés ensemble (comm. personnelle Merny). Chacune de ces deux espèces étant relativement rare, leur coexistence dans un même échantillon de sol semble assez

étonnante. Peut-être nous trouvons nous en face d'une formation nouvelle d'*H. sacchari*.

La présence de 18 chromosomes dans un oocyte d'*H. oryzae* en télophase I (Fig. 2 B) semble indiquer que la réduction du nombre de chromosomes pendant l'ovogénèse n'a pas toujours lieu. Si un tel oeuf est fécondé il peut se faire qu'un nématode triploïde soit formé.

Bien que cette hypothèse puisse paraître assez aventurée, elle nous induit à entreprendre une expérimentation en vue de produire systématiquement des individus polyploïdes. Il est possible qu'une telle expérience conduite à des résultats susceptibles de permettre une meilleure compréhension de l'évolution à l'intérieur des différentes espèces des Heteroderidae.

SUMMARY

Oogenesis and reproduction of Heterodera oryzae and H. sacchari (Nematoda: Heteroderidae)

A cytological study of *H. oryzae* and *H. sacchari* has shown that *H. oryzae* is diploid and possesses 18 chromosomes (nn). During oogenesis of *H. oryzae* the number of chromosomes is reduced to the haploid number of nine. *H. sacchari* has a mitotic type of maturation and has 27 chromosomes. Single larval inoculations have shown that *H. oryzae* is an amphimictic species, while *H. sacchari* is parthenogenetic.

BIBLIOGRAPHIE

- COTTEN, J. (1960). Observations on the cytology of the potato-root eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Nematologica* Suppl., II, 123-126.
- (1965). Cytological investigations in the genus *Heterodera*. *Nematologica* **11**, 337-342.
- ELLENBY, C. (1957). An investigation into the possibility of parthenogenesis in the Potato-root Eelworm. *Nematologica* **2**, 250-254.
- GOLDEN, A. M. (1959). Significance of males in reproduction of the sugar-beet nematode. *Pl. Dis. Repr* **43**, 979-980.
- LUC, M. & BERDON-BRIZUELA, R. (1961). *Heterodera oryzae* n. sp. parasite du riz en Côte d'Ivoire. *Nematologica* **6**, 272-279.
- LUC, M. & MERNY, G. (1963). *Heterodera sacchari* n. sp. (Nematoda: Tylenchoidea) parasite de la canne à sucre au Congo-Brazzaville. *Nematologica* **9**, 31-37.
- MULVEY, R. H. (1959). Preliminary studies on oogenesis in a cyst-forming nematode *Heterodera avenae* (Nematoda: Heteroderidae). *Nematologica* **4**, 1-2.
- (1960). Oogenesis in some species of *Heterodera* and *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae). In: *Nematology-Fundamentals and Recent advances*. Ed: J. N. Sasser & W. R. Jenkins, Univ. of North Carolina, Chapel Hill, pp. 323-330.
- NETSCHER, C., LUC, M. & MERNY, G. (1969). Redescription du mâle d'*Heterodera sacchari* (Nematoda: Heteroderidae). *Nematologica*, **15**, 156-157.
- DEN OUDEN, H. (1960). A note on parthenogenesis and sex determination in *Heterodera rostochiensis* Woll. *Nematologica* **5**, 215-216.
- TRIANAPHYLLOU, A. C. (1962). Oogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* **7**, 105-113.
- (1963). Polyploidy and parthenogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria*. *J. Morph.* **113**, 489-499.
- (1966). Polyploidy and Reproductive Patterns in the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *J. Morph.* **118**, 403-414.
- TRIANAPHYLLOU, A. C. & HIRSCHMANN, H. (1962). Oogenesis and mode of reproduction in the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Nematologica* **7**, 235-241.
- TYLER, J. (1933). Reproduction without males in aseptical root cultures of the root-knot nematode. *Hilgardia* **7**, 373-388.

Accepté le 19 Août, 1968.

Phyt.

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET
TECHNIQUE OUTRE-MER

(O. R. S. T. O. M.)

DEPARTEMENT DE NEMATOLOGIE

PUBLICATION N° 64

L'ovogénèse et la reproduction chez
Heterodera oryzae et *H. sacchari* (Nematoda: Heteroderidae)

par

C. Netscher

Extrait de: *NEMATOLOGICA*, 15, 1, 1969

134.87

B